

# PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>341046/18210</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 00/ 01887</b>	Date du dépôt international(jour/mois/année) <b>03/07/2000</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>01/07/1999</b>
Déposant  <b>INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHER ...</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

**1. Base du rapport**

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présente par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

**4. En ce qui concerne le titre.**

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**5. En ce qui concerne l'abrégé.**

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

**6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°**

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01887

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C12Q1/68 A61P43/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>✓ LABERGE ET AL.: "FAMILIAL CAVERNOUS ANGIOMAS CCM1 GENE"</p> <p>EUR. J. HUM. GEN.,</p> <p>vol. 6/suppl.1, mai 1998 (1998-05), page 146/P4.168 XP002136142</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	1-24
Y	<p>✓ SEREBRIISKII ET AL.: "ASSOCIATION OF KREV-1/RAP1A WITH KRIT1, A NOVEL ANKYRIN REPEAT-CONTAINING PROTEIN ENCODED BY A GENE MAPPING TO 7q21-22"</p> <p>ONCOGENE,</p> <p>vol. 15, 1997, pages 1043-1049, XP000892143</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-24

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hagenmaier, S



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>✓ LABERGE ET AL.: "GENETIC HETEROGENEITY AND ABSENCE OF FOUNDER EFFECT IN A SERIES OF 36 FRENCH CEREBRAL CAVERNOUS ANGIOMAS FAMILIES"</p> <p>EUR.J.HUM.GEN., vol. 7, mai 1999 (1999-05), pages 499-504, XP000892146 le document en entier ----</p>	
A	<p>✓ CRAIG ET AL.: "MULTILOCUS LINKAGE IDENTIFIES TWO NEW LOCI FOR A MENDELIAN FORM OF STROKE, CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATION, AT 7p15-13 AND 3q25.2-27"</p> <p>HUM.MOL.GEN., vol. 7, no. 12, 1998, pages 1851-1858, XP002136143 le document en entier ----</p>	
P,Y	<p>✓ SAHOO ET AL.: "Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rapla binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1) "</p> <p>HUM.MOL.GEN., vol. 8, no. 12, novembre 1999 (1999-11), XP002136144 le document en entier ----</p>	1-24
P,Y	<p>✓ COUTEULX SOPHIE LABERGE-LE ET AL: "Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas."</p> <p>NATURE GENETICS, vol. 23, no. 2, octobre 1999 (1999-10), pages 189-193, XP002151276 ISSN: 1061-4036 le document en entier -----</p>	1-24



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/01887

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12Q1/68 A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LABERGE ET AL.: "FAMILIAL CAVERNOUS ANGIOMAS CCM1 GENE" EUR.J.HUM.GEN., vol. 6/suppl.1, May 1998 (1998-05), page 146/P4.168 XP002136142 the whole document	1-24
Y	SEREBRIISKII ET AL.: "ASSOCIATION OF KREV-1/RAP1A WITH KRIT1, A NOVEL ANKYRIN REPEAT-CONTAINING PROTEIN ENCODED BY A GENE MAPPING TO 7q21-22" ONCOGENE, vol. 15, 1997, pages 1043-1049, XP000892143 the whole document	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 October 2000

Date of mailing of the international search report

09/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/FR 00/01887

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LABERGE ET AL.: "GENETIC HETEROGENEITY AND ABSENCE OF FOUNDER EFFECT IN A SERIES OF 36 FRENCH CEREBRAL CAVERNOUS ANGIOMAS FAMILIES" EUR.J.HUM.GEN., vol. 7, May 1999 (1999-05), pages 499-504, XP000892146 the whole document ---	
A	CRAIG ET AL.: "MULTILOCUS LINKAGE IDENTIFIES TWO NEW LOCI FOR A MENDELIAN FORM OF STROKE, CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATION, AT 7p15-13 AND 3q25.2-27" HUM.MOL.GEN., vol. 7, no. 12, 1998, pages 1851-1858, XP002136143 the whole document ---	
P,Y	SAHOO ET AL.: "Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rapla binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1)" HUM.MOL.GEN., vol. 8, no. 12, November 1999 (1999-11), XP002136144 the whole document ---	1-24
P,Y	COUTEULX SOPHIE LABERGE-LE ET AL: "Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas." NATURE GENETICS, vol. 23, no. 2, October 1999 (1999-10), pages 189-193, XP002151276 ISSN: 1061-4036 the whole document -----	1-24



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 en sa qualité d'office élu

<b>Date d'expédition</b> (jour/mois/année) 02 mai 2001 (02.05.01)	
<b>Demande internationale no</b> PCT/FR00/01887	<b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b> 341046/18210
<b>Date du dépôt international</b> (jour/mois/année) 03 juillet 2000 (03.07.00)	<b>Date de priorité</b> (jour/mois/année) 01 juillet 1999 (01.07.99)
<b>Déposant</b> TOURNIER-LASSERVE Elisabeth etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

29 janvier 2001 (29.01.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

R. Forax

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and the role of the accounting department in ensuring the integrity of the financial statements. It also highlights the need for transparency and accountability in the reporting process.

2. The second part of the document outlines the various methods used to collect and analyze data, including surveys, interviews, and focus groups. It emphasizes the importance of using a mix of qualitative and quantitative techniques to gain a comprehensive understanding of the research topic.

3. The third part of the document presents the results of the study, which show a significant positive correlation between the variables being investigated. The findings suggest that the proposed intervention could have a beneficial impact on the target population.

4. The fourth part of the document discusses the limitations of the study and offers suggestions for future research. It acknowledges that the sample size was relatively small and that the study was conducted in a specific context, which may limit the generalizability of the findings.

5. The fifth part of the document provides a conclusion and summarizes the key findings of the study. It reiterates the importance of the research and the potential implications for practice and policy.

PCT

REC'D 10 OCT 2001

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire 341046/18210	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01887	Date du dépôt international (jour/mois/année) 03/07/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 01/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12Q1/68		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA ... et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 29/01/2001	Date d'achèvement du présent rapport 02.10.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé BROCHADO GARGANTA, M N° de téléphone +49 89 2399 8935 



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01887

**I. Base du rapport**

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

**Description, pages:**

1-22                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-24                      version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/3-3/3                      version initiale

**Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:**

1-9, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.





**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01887

- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :  
☐ des revendications, n<sup>os</sup> :  
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-24 Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications Non : Revendications 1-24
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-24 Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**



**Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Il est fait référence aux documents suivants:

(A) Laberge et al.: Eur.J.Hum.Gen., vol. 6/suppl.1, mai 1998 (1998-05), page 146/P4.168

(B) Serebriiskii et al.:ONCOGENE, vol. 15, 1997, pages 1043-1049

2. Les documents suivants cités comme documents "P" dans le rapport de recherche peuvent être considérés comme compris dans l'état de la technique si la date de priorité de la présente demande n'est pas valablement revendiqué:

(C) Sahoo et al.: HUM.MOL.GEN., vol. 8, no. 12, novembre 1999 (1999-11),

(D) Couteux Sophie Laberge-le et al.: NATURE GENETICS, vol. 23, no. 2, Octobre 1999 (1999-10), pages 189-193

3. Les revendications 1-24 sont conformes aux critères de nouveauté défini par l'article 33(2) PCT, parce que leurs caractéristiques ne sont pas connues dans l'état de la technique.

4.1 Le document A qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, décrit une méthode de diagnostic des angiomes caverneux ou cavernomes pour la détection de mutations dans le gène Krit1. Cette détection est mise en oeuvre au moyen de séquences nucléotidiques (voir résumé).

L'objet de la revendication 1 diffère de la description donnée dans le



document A en ce que les séquences nucléotidiques sont légèrement différentes.

Les **séquences nucléotidiques du Krit1 cDNA et de la protéine** correspondante sont connues (voir document B, figure 1). Le document B décrit l'association de Krev-1/rap1 avec **Krit1**.

Par conséquent, les séquences nucléotidiques dans la revendication 1 sont simplement des possibilités que la personne du métier pourrait choisir, selon le cas d'espèce, parmi plusieurs possibilités évidentes. Aucune activité inventive n'est donc impliquée (article 33(3) PCT).

- 4.2 L'objet des revendications, concernant l'utilisation de tout ou partie du gène Krit1 pour la détection d'une mutation dans ce gène, à des fins thérapeutiques ou pour la préparation d'un médicament destiné à contrôler ou inhiber l'angionèse, n'est pas inventive (article 33(3) PCT), parce que document A décrit déjà une association des mutations dans le gène Krit1 avec le diagnostic des cavernomes (voir résumé). Il est évident pour la personne du métier de combiner les descriptions des documents A et B et d'obtenir ainsi l'objet selon les revendications 2, 8 et 17. L'objet de ces revendications n'implique par conséquent pas d'activité inventive (article 33(3) PCT). Le même raisonnement s'applique pour l'objet des revendications dépendants 3-7,9- 16 et 18.

Le vecteur d'expression dans une cellule hôte appropriée, qui comporte la séquence du gène Krit1 (revendication 19) et une composition thérapeutique avec tout ou partie de la protéine Krit1 (revendication 23) ne sont pas inventives (article 33(3) PCT), parce que pour la personne du métier, l'utilisation d'un vecteur pour l'expression de Krit1 dans une cellule hôte ou l'utilisation de la protéine Krit1 à des fins thérapeutiques est une démarche technique normale et n'implique par conséquent pas d'activité inventive. Le même raisonnement s'applique pour l'objet des revendications dépendantes 20-22 et 24.



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 341046/18210	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01887	International filing date ( <i>day month year</i> ) 03 July 2000 (03.07.00)	Priority date ( <i>day month year</i> ) 01 July 1999 (01.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 29 January 2001 (29.01.01)	Date of completion of this report 02 October 2001 (02.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01887

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments)*

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1-22, as originally filed.  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand.  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims. Nos. 1-24, as originally filed.  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19.  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand.  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings. sheets fig 1/3-3/3, as originally filed.  
 sheets fig \_\_\_\_\_, filed with the demand.  
 sheets fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_  
 sheets fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings. sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01887

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-24	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1. Reference is made to the following documents:

(A) Laberge et al.: Eur.J.Hum.Gen., vol.6/suppl.1, May 1998 (1998-05), page 146/P4.168

(B) Serebriiskii et al.: ONCOGENE, vol.15, 1997, pages 1043-1049

#### 2. The following documents cited as "P" documents in the search report may be considered to be included in the prior art if the priority date of the present application were not validly claimed:

(C) Sahoo et al.: HUM.MOL.GEN., vol.8, no.12, November 1999 (1999-11)

(D) Coulteulx Sophie Laberge-le et al.: NATURE GENETICS, vol.23, no.2, October 1999 (1999-10), pages 189-193

#### 3. Claims 1-24 meet the requirement of novelty of PCT Article 33(2) because the features of said claims are not known from the prior art.

#### 4.1 Document A, which is considered to be the closest prior art, describes a method for diagnosing



cavernous angiomas or cavernomas in order to detect mutations in the *Krit1* gene. This detection is carried out by means of nucleotide sequences (see abstract).

The subject matter of Claim 1 differs from the description provided in document A in that the nucleotide sequences are slightly different.

The **nucleotide sequences** of the ***Krit1* cDNA** and of **the** corresponding **protein** are known (see document B, Figure 1). Document B describes the association of Krev-1/rap1 with ***Krit1***.

Consequently, the nucleotide sequences in Claim 1 are merely possibilities which a person skilled in the art might select, depending on the particular case, from a number of obvious possibilities. An inventive step is not therefore involved (PCT Article 33(3)).

- 4.2 The subject matter of the claims relating to the use of all or part of the *Krit1* gene to detect a mutation in said gene, for therapeutic purposes or to prepare a drug for controlling or inhibiting angiogenesis, is not inventive (PCT Article 33(3)) because document A already describes an association of the mutations in the *Krit1* gene with the diagnosis of cavernomas (see abstract). It is obvious for a person skilled in the art to combine the descriptions of documents A and B and to thus obtain the subject matter according to Claims 2, 8 and 17. The subject matter of said claims does not therefore involve an inventive step (PCT Article 33(3)). The same reasoning applies for the subject



matter of dependent Claims 3-7, 9-16 and 18.

The expression vector in a suitable host cell, which comprises the Krit1 gene sequence (Claim 19), and a therapeutic composition with all or part of the Krit1 protein (Claim 23) are not inventive (PCT Article 33(3)) because, for a person skilled in the art, using a vector to express Krit1 in a host cell or using the Krit1 protein for therapeutic ends is a standard technical step and does not therefore involve an inventive step. The same reasoning applies for the subject matter of dependent Claims 20-22 and 24.









11

**UTILISATION DU GENE *KRIT1*  
DANS LE DOMAINE DE L'ANGIOGENESE**

5

La présente invention a pour objet une méthode de diagnostic des angiomes caverneux ou cavernomes pour la détection de mutations dans le gène *Krit1*. En particulier, cette détection est mise en œuvre au moyen de séquences nucléotidiques également objet de la présente invention. L'invention concerne également l'utilisation de tout ou partie du gène *Krit1* à des fins thérapeutiques dans le domaine de la pro ou anti-angiogénèse.

Les cavernomes sont des malformations vasculaires le plus souvent localisées dans le système nerveux central mais également dans la rétine, le foie, les reins, etc.. et sont caractérisés par des cavités capillaires anormalement élargies sans intervention du parenchyme cérébral (Russell et al.). Les symptômes cliniques comprennent des céphalées, des hémorragies, des crises d'épilepsie et des déficits neurologiques focaux. La prévalence des angiomes caverneux est proche de 0,5 % dans la population générale (Otten et al.). Ces angiomes peuvent être transmis de façon héréditaire sous une forme autosomique dominante dans près de 50 % des cas (Rigamonti et al.). 3 localisations (ou loci) de malformations caverneuses cérébrales (CCM) ont été identifiées sur le bras long du chromosome 7, le bras court du chromosome 7 et le bras long du chromosome 3 (7q, 7p et 3q respectivement). Un important effet fondateur a été observé dans la population hispano-américaine, dans laquelle toutes les familles étaient liées au locus *CCM1* localisé sur 7q (Rigamonti et al. ; Dubovsky et al. ; Günel et al. ; et Craig et al.).

Les inventeurs ont récemment établi les caractéristiques génétiques et cliniques des cavernomes, ainsi que les caractéristiques héréditaires dans une série de 57 familles françaises (Labauge et al.). Des investigations de neuro-imagerie ont confirmé la grande fréquence de lésions multiples dans les cavernomes héréditaires. Une corrélation hautement significative a également été mise en évidence entre le nombre de lésions et l'âge du patient, ce qui suggère fortement la nature dynamique de ces malformations vasculaires appelées également hamartomes. L'analyse de liaison génétique conduite dans 36 de ces familles a montré que 65 % d'entre elles étaient liées au locus *CCM1* avec aucun effet fondateur (Laberge et al.).

La taille de l'intervalle génétique contenant le locus *CCM1* avait été réduite en 1995 à 4 centimorgans, le locus *CCM1* étant encadré par D7S2410 et D7S689 (Johnson et al.). Au moyen essentiellement d'une approche *in silico*, les inventeurs ont établi une carte physique et transcriptionnelle de l'intervalle de *CCM1*. Parmi les 53 unités transcriptionnelles cartographiées à l'intérieur de la région critique, l'une d'elles correspondait à *Krit1*, un gène dont le produit interagit avec Rap1A (également appelé Krev1), un membre de la famille des gènes Ras impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation et la morphogenèse (Bos et al.). En utilisant en combinaison la technique SSCP et le séquençage, les inventeurs ont identifié dans 8 familles *CCM1* non apparentées des mutations conduisant très probablement à une protéine Krit1 tronquée. La coségrégation de ces mutations avec le phénotype affecté suggère fortement que *Krit1* est la protéine mutée dans les familles atteintes de cavernomes liés au locus *CCM1* et suggère l'implication de la voie de transduction du signal de Rap1A dans la vasculogénèse et/ou l'angiogénèse.

En utilisant un contig de YAC préalablement publié, et les bases de données de séquences publiques (The Washington University Chromosome 7 Project), les inventeurs ont construit des contigs de BAC/PAC couvrant 90 % de l'intervalle *CCMI*, estimé à 1 600 Kb (Figure 1). 20 familles comprenant 179 méioses potentiellement informatives et dont il avait été précédemment montré qu'elles avaient une probabilité a posteriori d'être liées au locus *CCMI* supérieure à 90 % ont été utilisées pour cartographier finement ce locus avec des marqueurs polymorphes identifiés au moyen des séquences BAC/PAC (Figure 1). Un événement de recombinaison observé chez un individu affecté (famille 27 dans Labauge et al.) a permis aux inventeurs de réduire légèrement cet intervalle qui est maintenant encadré par M2456 (limite centromérique) et D7S689 (limite télomérique). Le criblage de banques de données publiques telles que Gene Map du Human Genome, Unigene et dBEST a permis aux inventeurs de cartographier à l'intérieur de cet intervalle 574 *Expressed Sequence Tags* (EST) qui ont ensuite été regroupées en 53 unités transcriptionnelles putatives comprenant 6 gènes déjà connus : CDK6, HUM1.D14, KRIT1, PEX-1, mMTERF et Yotiao.

*Krit1* avait été identifié lors d'un criblage destiné à identifier les protéines interagissant avec Rap1A/Krev1, un membre de la famille des gènes Ras (Serebriiski et al.). Il code pour une protéine de 529 acides aminés qui comprend 4 domaines ankyrines et interagit avec Rap1A/Krev1 au moyen de sa région carboxyterminale. Il a déjà été indiqué que l'ARN messager de *Krit1* était exprimé à des niveaux faibles dans de nombreux tissus y compris le cerveau. Bien que la fonction exacte de *Krit1* soit encore inconnue, les inventeurs ont considéré qu'il était un bon gène candidat pour *CCMI*, et ceci pour plusieurs raisons. Rap1A / Krev1A a été identifié sur la base de son homologie avec

*Dras3*, un homologue de Ras chez la drosophile, ainsi que sur la base de son activité anti-mitogène dans des fibroblastes transformés par K-ras (Pizon et al., 1988 / Kitayama et al., 1989). Bien que la pertinence physiologique de cet effet anti-mitogène observé *in vitro* n'ait pas encore été établie *in vivo*, ceci a conduit  
5 à considérer que cette protéine était un antagoniste de Ras. Un rôle de la voie de signalisation de Ras dans la vasculogenèse et l'angiogenèse a été fortement suggéré par les anomalies vasculaires observées dans les modèles murins invalidés pour les protéines impliquées dans cette voie, par exemple les protéines raf ou GAP120 (Henkemeyer et al., 1995 ; Wojnowski et al., 1997). En plus de  
10 ce rôle putatif en tant qu'antagoniste de Ras, Rap1A / Krev1 a été impliqué dans la différenciation cellulaire et la morphogenèse (Asha et al., 1999 ; Quarck et al., 1996 ; Pizon et al., 1988).

En d'autres termes, dans la mesure où la protéine Krit1 tronquée donne lieu à une anomalie de l'angiogenèse s'accompagnant d'une prolifération des  
15 cellules endothéliales, il est raisonnable d'en déduire que le gène *Krit1* pourrait avoir un rôle de contrôle de l'angiogenèse.

Ainsi, dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont montré que des mutations dans le gène *Krit1* susceptibles de donner lieu à une protéine Krit1 tronquée sont responsables de l'apparition d'anomalies vasculaires. Ces  
20 anomalies vasculaires peuvent affecter différents territoires incluant le cerveau et la peau et prendre différentes formes (cavernomes, angiomes capillaro-veineux). Le type des lésions observées (développement de maladies vasculaires anormales combiné à la nature des mutations observées (mutations entraînant une troncation de la protéine) suggèrent fortement que cette protéine exerce un  
25 contrôle de l'angiogenèse qui pourrait être susceptible d'applications

thérapeutiques dans le domaine de l'antiangiogenèse, en particulier dans le domaine tumoral.

L'alignement de l'ADNc de *Krit1* avec le BAC AC000020, l'un des BAC localisé dans l'intervalle, a permis aux inventeurs de déterminer la structure  
5 génomique de *Krit1*. Ce gène est codé par 12 exons qui sont tous compris dans le BAC AC000020. Les inventeurs ont dessiné les amorces oligonucléotidiques introniques destinées à amplifier les exons (Tableau n° 1) ainsi que les séquences de jonction (Tableau n° 2). Ces amorces ont été particulièrement délicates à mettre au point en raison de la richesse en bases A et T de *Krit1* et sont très  
10 spécifiques de *Krit1*. Ainsi, la présente invention a pour objet une séquence nucléotidique choisie dans le groupe comprenant SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17,  
15 SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28.

Au moyen de ces amorces, les inventeurs ont pu amplifier tous les exons. Un ensemble de 20 patients CCM non apparentés appartenant à des familles  
20 dans lesquelles l'analyse HOMOG a montré une probabilité *a posteriori* d'être liée au locus *CCMI* supérieure à 90 % a permis de procéder à des criblages de mutations par une analyse combinant une approche de type Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), dans 4 conditions distinctes, et une approche de séquençage.

25 Les produits amplifiés de 8 de ces patients ont montré des variants de conformation anormaux qui n'ont été observés dans aucun des 50 sujets

contrôles. L'analyse de la séquence de ces amplimères a révélé des mutations hétérozygotes dans ces 8 patients (Tableau 3 et Figure 3). Ces mutations coségrégeaient avec le phénotype malade dans les 8 familles de ces patients.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins une  
5 séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus pour la détection, à partir d'un prélèvement biologique, de la présence d'une mutation dans le gène *Krit1* ; de préférence une mutation liée à la survenue d'anomalies vasculaires telles que définies précédemment. De manière préférentielle, le prélèvement biologique est du sang.

10 Plus particulièrement, le pedigree 6 présente une délétion d'un A au nucléotide 1342, dans l'exon 10. Cette délétion conduit à un changement du cadre de lecture et ainsi à un codon stop prématuré. Dans le pedigree 10, une substitution de C par T au nucléotide 1283 dans l'exon 10 conduit au remplacement d'une glutamine par un codon stop. Le pedigree 58 montre quant  
15 à lui l'insertion d'un C après le nucléotide 1271, également dans l'exon 10, ce qui entraîne un changement du cadre de lecture et un codon stop prématuré. Le pedigree 41 montre une substitution de G par A au nucléotide 615 ce qui conduit au remplacement d'un tryptophane par un codon stop prématuré dans l'exon 5. Le pedigree 42 présente une délétion de 4 pb (nucléotides 681-684)  
20 dans l'exon 6 donnant lieu à un codon stop prématuré. Le pedigree 35 présente une délétion de 26 pb (nucléotides 1012-1037) à l'intérieur de l'exon 8 ; cette délétion causant un changement du cadre de lecture et un codon stop prématuré au codon 332. Le pedigree 18 présente une insertion d'un C à l'intérieur de l'exon 2 après le nucléotide 247 ; cette insertion conduit à un changement du  
25 cadre de lecture et à un codon stop prématuré. Le pedigree 19 montre une substitution d'un G par un A au nucléotide 261 ; celle-ci entraîne un changement de cadre de lecture ainsi qu'un codon stop prématuré au codon 79.



Les analyses SSCP des membres affectés et non affectés ont montré la coségrégation parfaite des mutations avec le phénotype affecté dans chacun de ces 8 pedigrees (Figure 3).

Ainsi, les séquences nucléotidiques conformes à la présente invention sont utilisées pour procéder à la détection d'une mutation dans au moins un exon du gène *Krit1*. Plus particulièrement, ces séquences nucléotidiques peuvent être utilisées par couple compte tenu de leur spécificité d'un exon selon la répartition suivante :

- SEQ ID N° 1 / SEQ ID N° 2 pour l'exon 1,
- 10        - SEQ ID N° 3 / SEQ ID N° 4 pour l'exon 2,
- SEQ ID N° 5 / SEQ ID N° 6 pour l'exon 3,
- SEQ ID N° 7 / SEQ ID N° 8 pour l'exon 4,
- SEQ ID N° 9 / SEQ ID N° 10 pour l'exon 5,
- SEQ ID N° 11 / SEQ ID N° 12 pour l'exon 6,
- 15        - SEQ ID N° 13 / SEQ ID N° 14 pour l'exon 7,
- SEQ ID N° 15 / SEQ ID N° 16 pour l'exon 8,
- SEQ ID N° 17 / SEQ ID N° 18 pour l'exon 9,
- SEQ ID N° 19 / SEQ ID N° 20 pour l'exon 10,
- SEQ ID N° 21 / SEQ ID N° 22 pour l'exon 10,
- 20        - SEQ ID N° 23 / SEQ ID N° 24 pour l'exon 11,
- SEQ ID N° 25 / SEQ ID N° 26 pour l'exon 12,
- SEQ ID N° 27 / SEQ ID N° 28 pour l'exon 12.

Avantageusement, la détection d'une mutation dans *Krit1* est précédée de l'amplification de l'exon dans lequel la mutation est recherchée et cette amplification peut être réalisée par PCR ou PCR-like.

La nature tronquante de ces mutations, leur absence chez les contrôles sains et leur conségégation avec le phénotype affecté suggère fortement qu'il s'agit de mutations délétères dans ces familles.

Les inventeurs n'ont pas détecté de variants de conformation anormaux  
5 de SSCP dans 12 des 20 familles testées. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ceci. La sensibilité de SSCP n'est pas de 100 % même lorsqu'on utilise plusieurs types de conditions comme cela a été le cas ici. De façon intéressante, aucun de ces variants de conformation anormaux n'a été observé dans le premier criblage qui a été réalisé à 20°C sans glycérol. De plus,  
10 les délétions qui emporteraient les régions contenant les séquences hybridant avec les amorces n'auraient pu être détectées par cette approche. Enfin, certaines de ces familles, bien que montrant une forte probabilité d'être liées au locus *CCM1*, pourraient en fait être liées à l'un des autres loci *CCM*.

La présente invention a également pour objet une méthode de diagnostic  
15 génotypique d'anomalies vasculaires chez un individu comprenant le prélèvement d'un échantillon biologique dudit individu ainsi que la détection de la présence d'une mutation dans le gène *Krit1* par analyse de la séquence d'acides nucléiques présents dans ledit échantillon, une telle mutation étant liée à la survenue d'anomalies vasculaires. La séquence d'acides nucléiques analysée  
20 peut être indifféremment de l'ADN génomique, de l'ADNc ou de l'ARNm. L'analyse peut être réalisée par hybridation, par séquençage ou par migration électrophorétique, en particulier par SSCP ou DGGE (Electrophorèse en gel en gradient dénaturant). La détection de ces mutations pourrait également être réalisée à l'aide d'une méthodologie permettant de détecter directement la  
25 présence de la protéine tronquée, par exemple les méthodes dites de Protein Truncation Test (traduction in vitro de transcrits reverse d'ADNc suivie d'une

révélation de la protéine par anticorps ou après marquage de la protéine à l'aide d'un acide aminé marqué). Enfin, la recherche de mutations peut être faite par analyse directe du transcrit reverse d'ADNc préparé à partir des ARN totaux (en particulier provenant de cellules transformées par le virus EBV, cellules dans  
5 lesquelles les auteurs ont montré l'expression du transcrit de *Krit1*).

Avantageusement, tout ou partie de la séquence d'acides nucléiques correspondant au gène *Krit1* est amplifiée préalablement à la détection de la présence d'une mutation, cette amplification pouvant être réalisée par PCR ou PCR-like. De façon tout à fait préférentielle, cette amplification peut être  
10 réalisée au moyen d'amorces choisies parmi les séquences d'acides nucléiques conformes à la présente invention, par exemple utilisées selon la répartition ci-dessus mentionnée.

La question principale est donc de comprendre comment ces mutations ont pu conduire aux cavernomes. Peu de choses sont connues en réalité sur la  
15 nature de ces lésions qui sont considérées comme des malformations vasculaires ou hamartomes. Il semblerait que la période d'apparition de ces malformations pendant la vie embryonnaire n'est pas tout à fait claire. De plus, dans certains cas, particulièrement dans les cas familiaux, l'extension évolutive de ces hamartomes a été décrite : il a été suggéré que ces lésions peuvent exprimer des  
20 facteurs et/ou des récepteurs impliqués dans l'angiogenèse (Rothbart et al., 1996 ; Notelet et al., 1997).

Il convient d'indiquer que les inventeurs ont observé dans quatre familles (Labauge et al., 1999) que des malformations cutanées (également appelées angiomes) pouvaient ségréger avec les cavernomes cérébraux.

Toutes les mutations rapportées ici conduiraient, si elles étaient traduites, à des protéines Krit1 tronquées qui seraient déletées de la région interagissant avec Rap1A / Krev1.

Les fonctions exactes de Rap1A / Krev1 ne sont pas tout à fait élucidées.

5 Ce membre de la famille des Ras GTPase est exprimé de façon ubiquitaire particulièrement dans les neutrophiles, les plaquettes et le cerveau ; il est localisé dans les compartiments endocytiques / lysosomiaux. Rap1A a été décrit comme interagissant avec B-Raf, ce qui est tout à fait intéressant au vu de l'apoptose massive endothéliale observée chez les souris déficientes pour B-Raf  
10 (Wojnowski et al., 1997). *In vivo*, des études sur les eucaryotes inférieurs tels que les levures et la drosophile ont récemment donné quelques indications sur les fonctions de Rap1A dans la différenciation et la morphogenèse (Asha et al.).

L'interaction de Krit1 et de Rap1A suggère que Krit1 pourrait soit réguler Rap1A soit être un effecteur de Rap1A (Bos et al.). Les mutations  
15 rapportées ici pourraient résulter soit d'un effet dominant négatif soit d'une perte de fonction. L'observation des familles présentant des délétions complètes de Krit1 serait un argument fort en faveur de cette hypothèse. Par ailleurs le fait que les formes sporadiques de cavernomes se manifestent principalement par une lésion unique et que les formes familiales se manifestent pas des lésions multiples  
20 suggère fortement que ces lésions suivent la règle du « *double hit de Knudson* » (Knudson 1971) et qu'une perte complète de fonction de Krit1 pourrait être nécessaire à l'apparition des cavernomes.

En d'autres termes, dans les formes dominantes de la maladie, une première mutation, présente dans toutes les cellules de l'organisme à l'état  
25 hétérozygote, serait présente. L'apparition des lésions cavernomateuses serait conditionnée par la survenue d'une deuxième mutation touchant l'autre allèle de ce gène, mutation qui surviendrait de façon somatique. Dans les formes sporadiques les plus étudiées à ce jour, l'individu ne présente aucune mutation germinale et la lésion unique résulterait de deux mutations survenues dans la  
30 même cellule.

Cependant, il existerait des formes sporadiques de cavernomes différentes de celles ci-dessus décrites. Les Inventeurs ont en effet mis en

évidence une forme sporadique se manifestant par des lésions multiples et résultant d'une mutation *de novo* dans le gène *Krit1* vraisemblablement dans une cellule germinale d'un des deux parents du patient atteint (données non montrées).

5           En résumé, les données reportées ici, suggèrent fortement que les mutations tronquantes de *Krit1* sont responsables de l'apparition des cavernomes cérébraux observés dans les familles *CCM1* mais également dans certaines formes sporadiques, mettant en exergue le rôle putatif de la voie de signalisation de Rap1A dans ces mécanismes.

10           Parmi les applications thérapeutiques concernées par la présente invention, pourraient être concernées différents types de malformations vasculaires, dysplasies vasculaires, angiomes et/ou toute situation où existe une angiogenèse anormale.

          Ainsi, la présente invention a également pour objet l'utilisation du gène  
15   *Krit1* ou d'une séquence dérivée de ce gène pour la préparation d'un médicament ou son utilisation dans une approche de type thérapie génique destiné à contrôler ou inhiber l'angiogenèse notamment par surexpression *in situ* du gène *Krit1* ou d'une séquence dérivée de ce gène.

          Par « séquence dérivée de ce gène », on entend toute séquence ou partie  
20 de séquence normale ou mutée du gène *Krit1* et présentant une activité similaire et comparable à la séquence totale fonctionnelle de référence.

          La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression dans une cellule hôte appropriée comportant la séquence du gène *krit1* ou une séquence dérivée de ce gène (la séquence dérivée est définie ci-dessus). Dans le  
25 cas où l'on souhaiterait réprimer une angiogenèse anormale, il pourrait être intéressant de surexprimer la séquence en question et c'est la raison pour laquelle le vecteur conforme à l'invention comprend, avantageusement, les éléments nécessaires à cette surexpression.

          En particulier, le vecteur conforme à l'invention peut être destiné à la  
30 thérapie génique et dans le cas où l'on souhaiterait limiter son site d'action, ce

vecteur peut comporter une séquence assurant le ciblage et/ou l'expression tissu spécifique des séquences qu'il comprend.

Enfin, la présente invention a pour objet une composition thérapeutique comportant à titre de principe actif tout ou partie de la protéine Krit1 normale  
5 ou modifiée, de façon à se substituer par exemple à une protéine tronquée et pallier la déficience. Le principe actif peut également être un vecteur tel que décrit précédemment.

La **Figure 1** représente la carte génétique, physique et transcriptionnelle du locus *CCM1*.

10 La Figure 1a représente la carte génétique du locus *CCM1*. Ce locus était précédemment défini par l'intervalle D7S2410-D7S689. Les intervalles génétiques réduits MS2456-D7S689 sont indiqués par des crochets horizontaux. Les microsatellites déjà publiés sont encadrés. Les nouveaux microsatellites sont identifiés par des caractères gras. Certains des STS sont également montrés. Le  
15 STS sWSS 1703 correspond aux nucléotides 393-658 de *Krit1*. Les marqueurs entre les crochets verticaux sont espacés de moins de 1 kb.

La Figure 1b représente la carte physique et transcriptionnelle du locus *CCM1*. Des contigs de BAC sont répartis sur l'intervalle *CCM1*. Le BAC AC000120 est représenté par le trait le plus épais. Les chevauchements avec soit  
20 les STS, soit les marqueurs microsatellites sont indiqués par des petites barres verticales. La flèche noire correspond à *Krit1*, les flèches blanches correspondent à des gènes humains bien caractérisés et les flèches vides correspondent à des gènes présentant de fortes homologues avec des gènes d'autres espèces (non caractérisés chez les humains).

La **Figure 2** représente la coségrégation des variants de conformation avec le phénotype malade au sein de 8 pedigrees (SSCP).

Les symboles vides désignent les sujets dont l'examen du cerveau par IRM est normal, les symboles noirs à moitié pleins correspondent à des patients  
5 asymptomatiques présentant des cavernomes sur l'examen par IRM, les symboles noirs pleins correspondent à des patients symptomatiques et présentant des cavernomes sur l'IRM ; le signe « ? » correspond aux sujets ayant un statut inconnu et le signe « \ » correspond à des patients décédés. Les patients décédés ou avec un statut inconnu n'ont pas été testés pour la mutation mais sont  
10 représentés pour une meilleure compréhension des structures familiales. Les bandes anormales sont indiquées par une flèche.

La **Figure 3** illustre les mutations de *Krit1*.

La Figure 3a représente la structure du gène *Krit1* et de la protéine putative correspondante. « ns » signifie non-sens, « del » signifie délétion et  
15 « ins » signifie insertion. Pour les insertions, le numéro de nucléotide correspond au nucléotide précédant l'insertion. L'expression « Krev Interacting Region » correspond à la région (acides aminés 483-529) dont la délétion abolit l'interaction avec Krev lors du test en double hybride dans la levure.

La Figure 3b représente les mutations de *Krit1*, identifiées dans les 8  
20 pedigrees mentionnés plus haut. Les flèches indiquent les sites de mutation. WT signifie séquence de type sauvage et MT signifie séquence mutante. Dans le pedigree 42, le chromatogramme et la séquence présentés correspondent au brin négatif ; le brin positif a montré une superposition complète des séquences normales et anormales et ne permettaient pas d'avoir une bonne visualisation du  
25 site du début de la délétion.

## EXEMPLES

### MATERIELS ET METHODES

#### Patients

5           20 patients non apparentés appartenant à des familles dont on savait qu'elles présentaient de façon héréditaire des cavernomes ont fait partie de l'étude avec leur libre consentement (Labauge et al.).

          L'analyse de ce panel de familles avec le test HOMOG a montré que ces familles avaient une probabilité *a posteriori* d'être liées au locus *CCM1*  
10           supérieure à 90 % (Laberge et al.).

          Une approche combinant biologie moléculaire et bio informatique a été utilisée pour établir la carte physique et transcriptionnelle du locus *CCM1*. Après validation d'un contig de YACs préalablement publiée par Johnson et al. (1995), les auteurs ont positionné dans l'intervalle par PCR et par une approche *in silico*  
15           574 EST (Expressed Sequence Tags) qu'ils ont regroupés en 53 groupes.

#### Réduction de l'intervalle génétique

          12 marqueurs microsatellites polymorphes recouvrant l'intervalle D7S2410-D7S689 ont été sélectionnés pour les analyses de liaison. 7 d'entre eux étaient préalablement connus : D7S2410, D7S2409, D7S1813, D7S1789,  
20           D7S646, D7S689 et D7S558, et ont été utilisés par plusieurs équipes (Günel et al. dans *Neurosurgery*, Craig et al., Labauge et al., Laberge et al.). Les derniers MS65, MS2453A, MS2456A, MS119 et MS120 ont été identifiés par les inventeurs sur la base des données de séquence des BAC cartographiés dans l'intervalle.

25



#### Détection des mutations et identification

Sur la base de la comparaison des séquences de l'ADNc de *Krit1* et du BAC AC 00000120, les inventeurs ont déterminé 14 jeux d'amorces pour amplifier les 12 exons et les sites de jonction exon / intron de *Krit1* à partir de  
5 l'ADN génomique. Des réactions de PCR ont été mises en œuvre comme suit : après une première étape initiale de dénaturation à 94°C (4 min), 30 cycles d'amplification consistant en des étapes à 94°C (15 s), une température d'hybridation optimisée comprise entre 45°C et 55°C (15s) et 72°C (15s) suivie par une étape d'extension finale à 72°C (10 min). Les produits de PCR ont été  
10 soumis à une électrophorèse dans 4 types de conditions (acrylamide à 10 % avec ou sans glycérol à 4°C et 20°C) sur un appareil Mighty Small II (Pharmacia-Biogen) utilisé en condition de courant constant de 35 mA. Des variants de conformation ont été révélés à l'argent (Silver Stain Plus kit, Biorad). Des amplimères montrant un pattern de bandes SSCP atypiques ont été séquencés  
15 (AB1377, Perkin Elmer). Toutes les mutations décelées lors du séquençage ont été testées pour leur coségrégation avec le phénotype malade par une approche SSCP.

**TABLEAU 1 : AMORCES**

EXON	AMORCE SENS	AMORCE REVERSE	TAILLE DE L'AMPLI-MERE
1	GAGCGGATAAAACTAAT (SEQ ID N° 1)	GAGCTAAAATTCATTCAA (SEQ ID N° 2)	205
2	GCTCTTAATGGGTTTTTG (SEQ ID N° 3)	AGCAATGTGGAGTAAAC (SEQ ID N° 4)	183
3	TTTGGAATGAGAACAGTC (SEQ ID N° 5)	GTCCTGTTGTATTTTCA (SEQ ID N° 6)	265
4	GTTGTTGTTTTTTGTTTG (SEQ ID N° 7)	ACCTGGAAAATAACTTAC (SEQ ID N° 8)	208
5	ATGTAATGCCTTTTTTCC (SEQ ID N° 9)	ATGCCTGGCTCTAACTAT (SEQ ID N° 10)	181
6	TTGTTAGATTGTGATGTA (SEQ ID N° 11)	AACATAATAAAACTTTC (SEQ ID N° 12)	257
7	TTTATAAAAGGAATGATG (SEQ ID N° 13)	TCAACTCAAACCATATCA (SEQ ID N° 14)	335
8	TGTAGCCTAATAACCAAA (SEQ ID N° 15)	AGCATAGCACAAGACCAT (SEQ ID N° 16)	243
9	GGTGAAGTTTTTAATATG (SEQ ID N° 17)	CAATAGTTTATGAAGTCC (SEQ ID N° 18)	213
10	ATATTTACAAAGGCAAGC (SEQ ID N° 19)	TGACATGATTGGTAAAAA (SEQ ID N° 20)	180
	TGGTACATTTTCCTTTCA (SEQ ID N° 21)	CTTTATGATTGCTGGGGC (SEQ ID N° 22)	201
11	GGTGAAGTTTTTAATATG (SEQ ID N° 23)	CAATAGTTTATGAAGTCC (SEQ ID N° 24)	205
12	AATAGATAGGGAAGTCC (SEQ ID N° 25)	GTGGCTTGAGTAACAGTT (SEQ ID N° 26)	234
	TAATGCCCACTGAAAGAA (SEQ ID N° 27)	GGCTGGTCTTGAAGTCTG (SEQ ID N° 28)	199

TABLEAU 2 : SEQUENCES DES JONCTIONS INTRON-EXON

EXON	POSITION SUR L'ADNc	TAILLE	SEQUENCE	POSITION SUR BAC AC000120
1	8-133	126	atcaggctcag ACAGAAAACT...TACAAATCGG gtaagagtgg (SEQ ID N° 29) (SEQ ID N° 30)	127165-127040
2	134-249	116	ccctttctag GTAGATAAAG...CAGAAGACAA gtaactgttc (SEQ ID N° 31) (SEQ ID N° 32)	126561-126445
3	250-393	144	taatgattag GGAACGACAG...ATGCATGCTG gtaaatggaa (SEQ ID N° 33) (SEQ ID N° 34)	126228-126086
4	394-550	157	ttttatcag GTATGGAAAA...AACGGATAGA gtaagtatt (SEQ ID N° 35) (SEQ ID N° 36)	118319-118163
5	551-657	107	acatttctag CATATAACAG...TAACAAACCA gtaagaatta (SEQ ID N° 37) (SEQ ID N° 38)	117464-117357
6	658-815	157	ttttcttag TATGAAAAAG...GAAAACCTCA gtaagaagt (SEQ ID N° 39) (SEQ ID N° 40)	114615-114459
7	816-967	152	tggttttctag GCCTTCAACT...TGAAAAACAG gtttctgg (SEQ ID N° 41) (SEQ ID N° 42)	113690-113539
8	968-1134	168	ttcctttaag ATTGAAGACC...GTTTCCTAAA gtaagtatt (SEQ ID N° 43) (SEQ ID N° 44)	106414-106248
9	1135-1222	88	gtgcttacag TGAAGAAAAAT...TGAATACAAAG gtaagcgtt (SEQ ID N° 45) (SEQ ID N° 46)	105616-105529
10	1223-1429	207	ttgttttag AATCTCAGTA...GGAAACTAAG gtagatttcc (SEQ ID N° 47) (SEQ ID N° 48)	105038-104832
11	1430-1546	117	tatgttcag GCTTTACTCA...TACAAAACAG gtaagtatca (SEQ ID N° 49) (SEQ ID N° 50)	93060-92942
12	1547-2004*	458*	tacttttag GCTCTGGTCG... (SEQ ID N° 51)	92441-91984*

\* Exon 12 non entièrement déterminé car contient des séquences *Alu*

TABLEAU 3 : MUTATIONS DANS KRIT1

MUTATIONS DANS L'ADN GENOMIQUE		MUTATIONS DES ACIDES AMINES	
6	Délétion (A) nt 1342 Exon 10	Changements en acides aminés après AA 438	Normal (WT): IF (438) TKASPSNHHKVIPVIVG... Mutant (MT): IF (438) TIRTAPAIHKSSLM*stop codon
10	Faux-sens (C → T) nt 1283 Exon 10	Changements en acides aminés après AA 420	WT : FL (420) QN... MT : FL (420) * stop codon
18	Insertion (C) après nt 247 Exon 2	Changements en acides aminés après AA 74	WT : ED (74) KERQWDD... MT : ED (74) QGTTVGR*stop codon
19	Faux-sens (G → A) nt 261 Exon 3	Changements en acides aminés après AA 79	WT : RQ (79) WVDD... MT : RQ (79) * stop codon
35	Délétion (26 pb) nt 1012 Exon 8	Changements en acides aminés après AA 328	WT : EA (328) RYNLLKGFYTAPDAKL... MT : EA (328) SSS* stop codon
41	Faux-sens (G → A) nt 615 Exon 5	Changements en acides aminés après AA 197	WT : NN (197) WEEAA... MT : NN (197) * stop codon
42	Délétion (GAAT) nt 681-684 Exon 6	Changements en acides aminés après AA 217	WT : IY (217) RMDGSYRSVELK... MT : IY (217) RMGHIVLLN*stop codon
58	Insertion (C) après nt 1271 Exon 10	Changements en acides aminés après AA 415	WT : LQ (415) RMFLQNCQIFTKASPSNHHK V... MT : LQ(415) HVLTLQTLTDIKGYKPPQQS*stop codon

### REFERENCES

1. Altschul, S.F., Madden T.L., Schaffer A. A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25** : 3389-3402. (1997)  
5
2. Asha H., de Ruiter N.D., Wang M.G. and Hariharan I.K. The Rap1 GTPase functions as a regulator of morphogenesis in vivo. *EMBO*, **18** : 605-615 (1999)
3. Bos J.L. All in the family ? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO*, **17** :6776-6782 (1998)  
10
4. Craig H.D., Günel M., Cepada O. et al. Multilocus linkage identifies two new loci for a Mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p1(-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Genet* **7**: 1851-1858. (1998)
5. Dubovsky J., Zabramsky J.M., Kurth J. et al. A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Mol Genet* **4** : 453-458. (1995)  
15
6. Ducros A., Denier C., Joutel A. et al. Recurrence of the T666M Calcium Channel CACNA1A Gene Mutation in Familial Hemiplegic Migraine with Progressive Cerebellar Ataxia. *Am J Hum Genet*, **64** : 89-98. (1999)
7. Eenson DA, Boguski MS, Lipman DJ et al. GenBank. *Nucleic Acids Res* **27** :12-7 (1999)  
20
8. Günel M., Awad I.A., Finberg K.S. et al. A Founder Mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans. *N Eng J Med* **334** : 946-951. (1996)
9. Günel M, Awad IA, Finberg K et al. Genetic heterogeneity of inherited cerebral cavernous malformation. *Neurosurgery* **38** : 1265-1271. (1996)  
25

10. Henkemeyer M., Rossi D.J., Holmyard D.P. et al. Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature* **377** : 695-701. (1995)
11. Huang X., Adams M.D., Zhou H. and Kerlavage A.R. A tool for analysing  
5 and annotating genomic sequences *Genomics* **46** : 37-45 (1997)
12. Johnson EW, Iyer LM, Rich SS et al. Refined Localization of the Cerebral  
Cavernous Malformation Gene (CCM1) to a 4 cM Interval of Chromosome  
7q Contained in a Well-defined YAC Contig. *Genome Research*, **5** : 368-  
380. (1995)
- 10 13. Kiayama H., Sugimoto Y., Matsuzaki T., Ikawa Y and Noda M. A ras-  
Related gene with Transformation Suppressor Activity. *Cell*, **56** : 77-84  
(1989)
14. Knudson AG Mutation and Cancer : Statistical study of retinoblastoma ;  
*Proc. Nat. Ac. Sci. USA* **68**, 820-823 (1971).
- 15 15. Labauge P., Laberge S., Brunereau L. et al. Hereditary cerebral cavernous  
angiomas : clinical and genetic features in 57 French families. *Lancet* **352** :  
1892-258. (1998)
16. Laberge S., Labauge P., Maréchal E., Maciazek J, Tournier-Lasserre E.  
Genetic heterogeneity and absence of founder effect in a series of 36 non  
20 Hispano-American cerebral cavernomas families. (*European Journal of  
Human Genetics*, in press)
17. Notelet L., Houtteville J.P., Khoury S., Lechevalier B. and Chapon F.  
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cerebral cavernomas : an  
immunocytochemical study of 42 cases. *Surg Neurol* **47** : 364-70 (1997)

18. Oten P, Pizzolata GP, Rilliet B, Berney J. A propos de 131 cas d'angiomes caverneux (cavernomes) du SNC, repérés par l'analyse rétrospective de 24 535 autopsies. *Neurochirurgie* **35** :82-83 (1989)
19. Pizon V., Chardin P., Lerosey I., Olofsson B. and Tavitian A. Human  
5 cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the effector region. *Oncogene*, **3** : 201-204 (1988)
20. Pizon V., Cifuentes-Diaz C., Mege RM., Baldacci G. and Rieger F.  
Expression and localization of Rap1 proteins during myogenic  
10 differentiation. *Eur J Cell Biol*, **69** : 224-235 (1996)
21. Quarck R., Berrou E., Magnier C., Bobe R., Bredoux R., Tobelem G.,  
Enouf E and Bryckaert M. Differential up-regulation of Rap1a and Rap1b  
proteins during smooth muscle cell cycle. *Eur J Cell Biol* **70** : 269-277  
(1996)
- 15 22. Rigamonti D, Hadley MN, Drayer BP et al. Cerebral cavernous malformations. Incidence and familial occurrence. *N Engl J Med* **319** : 343-347. (1988)
23. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386** : 671-674. (1997)
24. Russell DS, Rubenstein LJ. Pathology of tumours of the nervous system. 5<sup>th</sup>  
20 ed. Baltimore, Md ; Williams and Wilkins :730-736. (1989)
25. Rothbart D., Awad I.A., Lee J., Kim J., Harbaugh R., Crisculo G.R.  
Expression of Angiogenic Factors and Structural Proteins in Central  
Nervous System Vascular Malformations. *Neurosurgery* **38** : 915-925  
(1996)
- 25 26. Rozen S., Skaletsky H.J. Primer 3

[http://www.genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) (1996, 1997)

27. Serebriiskii I., Estojak J., Sonoda G. et al. Association of Krev1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22 *Oncongene* **15** : 1043-1049. (1997)
28. Wojnowski L., Zimmer A.M., Beck T.W. et al. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nature Genet* **16** : 293-297. (1997)
29. Xu HP., Wang Y., Riggs M., Rodgers L. and Wigler M. Biological activity of the mammalian RAP genes in yeast. *Cell Regul* **1** :763-9 (1990)



### REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique choisie dans le groupe comprenant SEQ ID N° 1,  
5      SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6,  
SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11,  
SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N°  
16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID  
N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ  
10      ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28.
2. Utilisation d'au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 1,  
pour la détection, à partir d'un prélèvement biologique, de la présence d'une  
mutation dans le gène *Krit1*.
- 15      3. Utilisation d'au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 2,  
pour la détection, à partir d'un prélèvement biologique, de la présence d'une  
mutation dans le gène *Krit1* liée à la survenue de cavernomes.
- 20      4. Utilisation selon l'une des revendications 2 et 3, caractérisée en ce que la  
détection de la mutation est effectuée dans au moins un exon du gène *Krit1*.
5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée par le fait qu'un couple de  
séquences est spécifique d'un exon selon la répartition suivante :  
25      - SEQ ID N° 1 / SEQ ID N° 2 pour l'exon 1,  
- SEQ ID N° 3 / SEQ ID N° 4 pour l'exon 2,

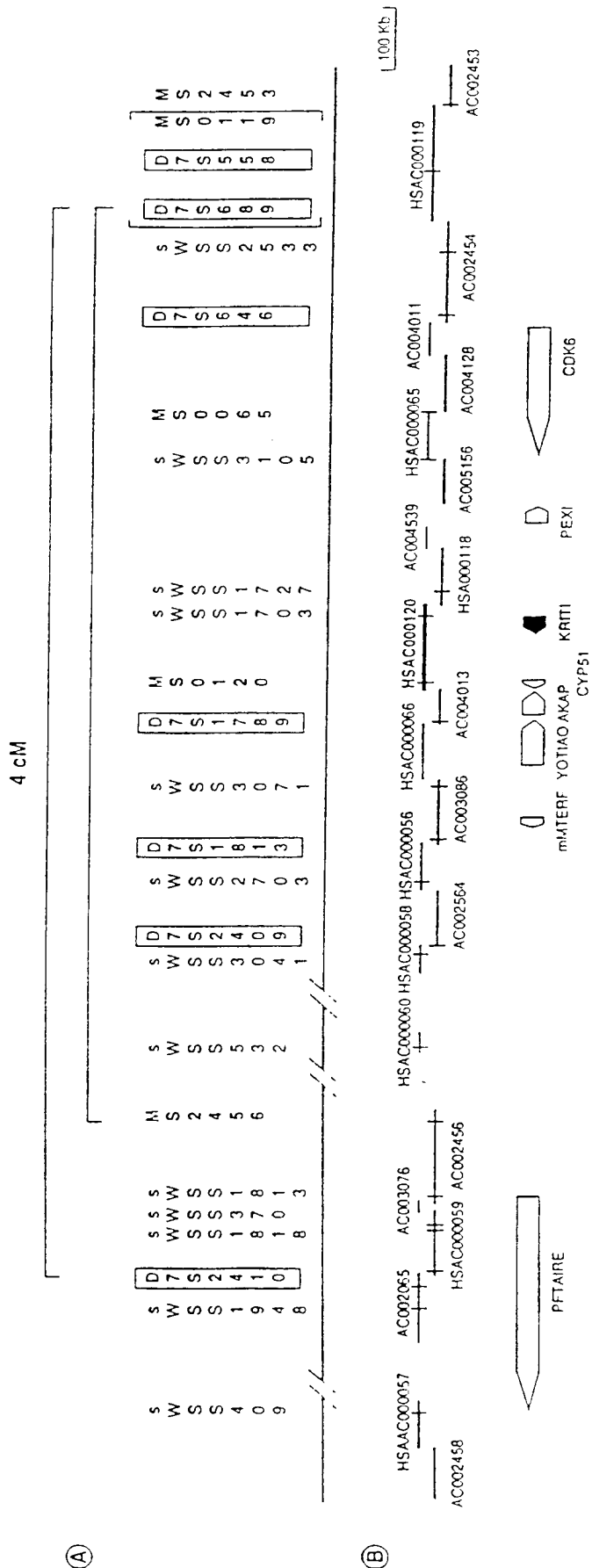
- SEQ ID N° 5 / SEQ ID N° 6 pour l'exon 3,
  - SEQ ID N° 7 / SEQ ID N° 8 pour l'exon 4,
  - SEQ ID N° 9 / SEQ ID N° 10 pour l'exon 5,
  - SEQ ID N° 11 / SEQ ID N° 12 pour l'exon 6,
  - 5 - SEQ ID N° 13 / SEQ ID N° 14 pour l'exon 7,
  - SEQ ID N° 15 / SEQ ID N° 16 pour l'exon 8,
  - SEQ ID N° 17 / SEQ ID N° 18 pour l'exon 9,
  - SEQ ID N° 19 / SEQ ID N° 20 pour l'exon 10,
  - SEQ ID N° 21 / SEQ ID N° 22 pour l'exon 10,
  - 10 - SEQ ID N° 23 / SEQ ID N° 24 pour l'exon 11,
  - SEQ ID N° 25 / SEQ ID N° 26 pour l'exon 12,
  - SEQ ID N° 27 / SEQ ID N° 28 pour l'exon 12.
6. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisée par le fait que la
- 15 détection d'une mutation est précédée de l'amplification de l'exon dans lequel la mutation est recherchée.
7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que l'amplification est réalisée par PCR ou PCR-like.
- 20
8. Méthode de diagnostic génotypique de cavernomes chez un individu, caractérisé par le fait que l'on prélève un échantillon biologique dudit individu, que l'on détecte la présence d'une mutation dans le gène *Krit1*, par analyse de la séquence nucléique présente dans ledit échantillon, une telle
- 25 mutation étant liée à la survenue de cavernomes.

9. Méthode de diagnostic selon la revendication 8, caractérisée par le fait que la séquence d'acide nucléique est de l'ADN génomique, de l'ADNc ou de l'ARNm.
- 5 10. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisée par le fait que ladite analyse est réalisée par hybridation.
11. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisée par le fait que ladite analyse est réalisée par séquençage.
- 10 12. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisée par le fait que ladite analyse est réalisée par migration électrophorétique, et plus particulièrement par SSCP ou DGGE.
- 15 13. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisée par le fait que ladite analyse est réalisée par une méthodologie visant à détecter la troncation d'une protéine.
- 20 14. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 8 à 13, caractérisée par le fait que tout ou partie de la séquence d'acide nucléique correspondant au gène *Krit1* est amplifiée préalablement à la détection de la présence d'une mutation.
- 25 15. Méthode de diagnostic selon la revendication 14, caractérisée par le fait que l'amplification est réalisée par PCR ou PCR-like.

16. Méthode de diagnostic selon la revendication 15, caractérisée par le fait que les amorces pour réaliser l'amplification sont parmi les séquences définies dans la revendication 1, de préférence dans la revendication 5.
- 5 17. Utilisation du gène *Krit1* ou d'une séquence dérivée de ce gène pour la préparation d'un médicament destiné à contrôler ou inhiber l'angiogenèse.
18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que le médicament est destiné à la thérapie génique.
- 10 19. Vecteur d'expression dans une cellule hôte appropriée, caractérisé en ce qu'il comporte la séquence du gène *Krit1* ou une séquence dérivée de ce gène.
- 15 20. Vecteur d'expression selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments nécessaires à la surexpression de la séquence.
21. Vecteur selon les revendications 19 ou 20, destiné à une utilisation selon l'une des revendications 17 et 18.
- 20 22. Vecteur selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence assurant le ciblage et/ou l'expression tissu spécifique.

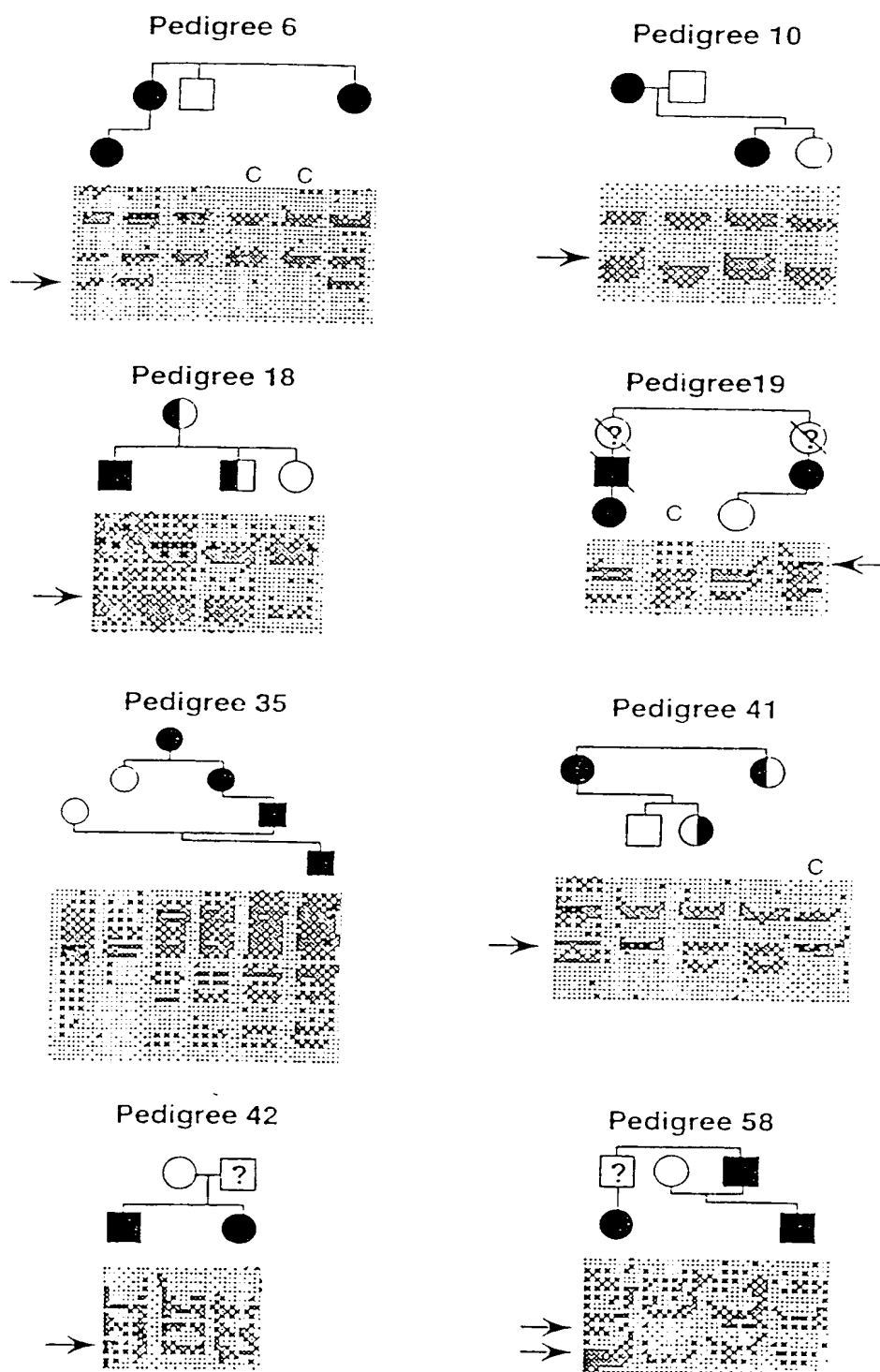
23. Composition thérapeutique caractérisée en ce qu'elle comporte à titre de principe actif au moins tout ou partie de la protéine Krit1 normale ou modifiée.
- 5 24. Composition selon la revendication 23, caractérisée en ce que le composé est un vecteur selon l'une des revendications 19 à 22.













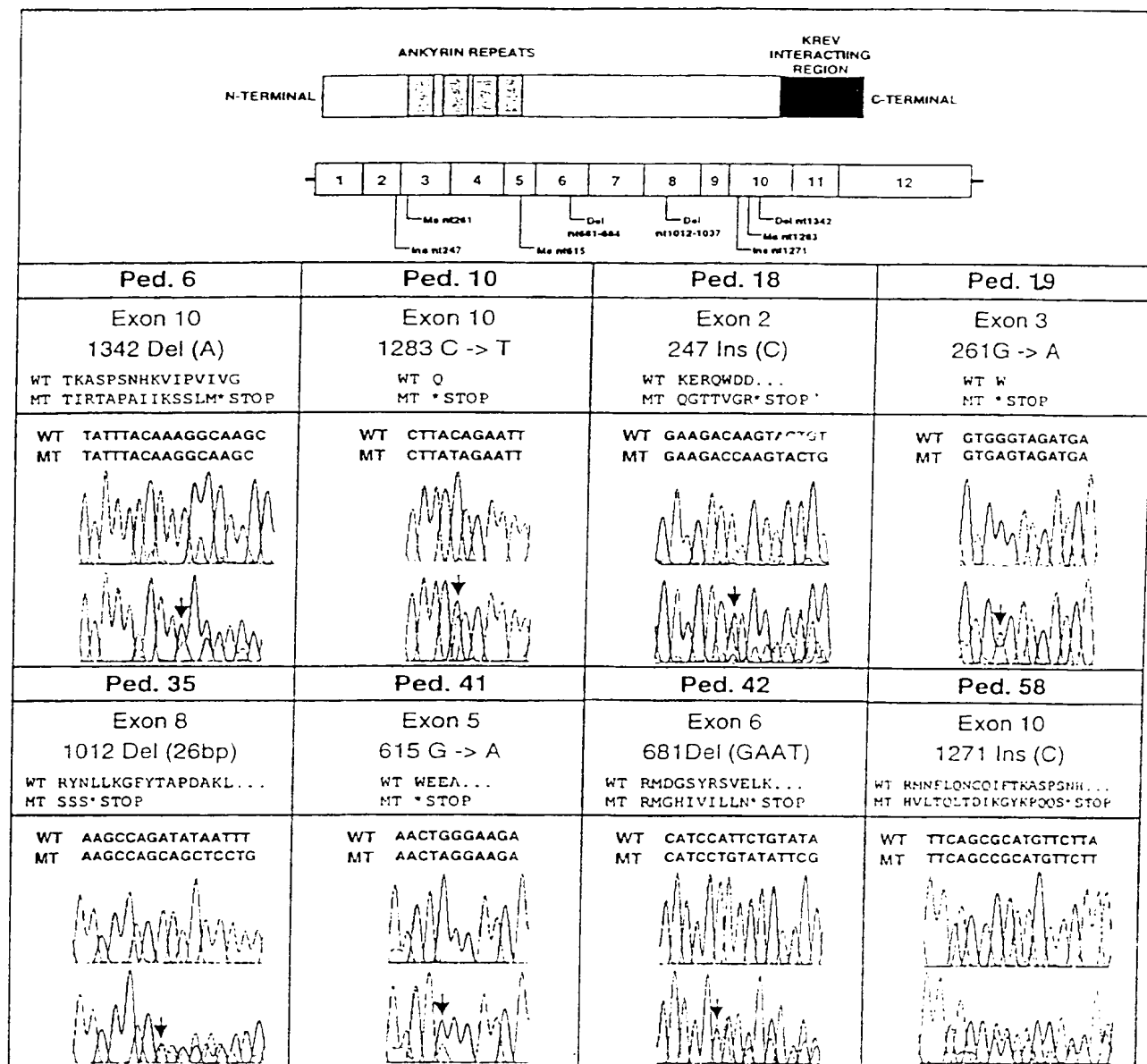


FIGURE 3



## LISTAGE DE SEQUENCE

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE - INSERM

<120> D18210

<130> Utilisation du gène *Krit1* dans le domaine de l'angiogenèse

<140>

<141>

<160> 51

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce sens

<400> 1

gagcggataa aaactaat

18

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce reverse

<400> 2

gagctaaaat tcattcaa

18

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce sens

<400> 3

gctcttaatg ggtttttg

18

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce reverse

<400> 4

agcaatgtgg agtaaaac

18



<210> 5  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce sens

<400> 5  
tttggaatga gaacagtc

18

<210> 6  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce reverse

<400> 6  
gtcctgttgt atttttca

18

<210> 7  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce sens

<400> 7  
gttggtgttt tttgtttg

18

<210> 8  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce reverse

<400> 8  
acctggaaaa taacttac

18

<210> 9  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce sens

<400> 9  
atgtaatgcc ttttttcc

18

<210> 10  
<211> 18





<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce reverse

<400> 10  
atgcctggct ctaactat 18

<210> 11  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce sens

<400> 11  
ttgttagatt gtgatgta 18

<210> 12  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce reverse

<400> 12  
aacataataa aaactttc 18

<210> 13  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce sens

<400> 13  
tttataaaaag gaatgatg 18

<210> 14  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce reverse

<400> 14  
tcaactcaaa ccatatca 18

<210> 15  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence



<220>  
<223> Amorce sens  
  
<400> 15  
tgtagcctaa taaccaaa  
  
<210> 16  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

18

<220>  
<223> Amorce reverse  
  
<400> 16  
agcatagcac aagaccat  
  
<210> 17  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

18

<220>  
<223> Amorce sens  
  
<400> 17  
ggtgaagttt ttaatatg  
  
<210> 18  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

18

<220>  
<223> Amorce reverse  
  
<400> 18  
caatagttta tgaagtcc  
  
<210> 19  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

18

<220>  
<223> Amorce sens  
  
<400> 19  
atatttacia aggcaagc  
  
<210> 20  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

18

<220>  
<223> Amorce reverse



<400> 20  
tgacatgatt ggtaaaaa 18

<210> 21  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce sens

<400> 21  
tggtacattt tcctttca 18

<210> 22  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce reverse

<400> 22  
ctttatgatt gctggggc 18

<210> 23  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce sens

<400> 23  
ggtgaaqttt ttaatatg 18

<210> 24  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce reverse

<400> 24  
caatagttta tgaagtcc 18

<210> 25  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce sens

<400> 25  
aatagatagg gaactgcc 18



<210> 26  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce reverse

<400> 26  
gtggcttgag taacagtt

18

<210> 27  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce sens

<400> 27  
taatgcccac tgaaagaa

18

<210> 28  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amorce reverse

<400> 28  
ggctgggtctt gaactctg

18

<210> 29  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 29  
atcaggtcag acagaaaact

20

<210> 30  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
tacaaatcgg gtaagagttg

20

<210> 31  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 31  
ccctttctag gtagataaag

20

<210> 32





<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 32  
cagaagacaa gtactgtttc

20

<210> 33  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 33  
taatgattag ggaacgacag

20

<210> 34  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 34  
atgcatgctg gtaaattggaa

20

<210> 35  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 35  
ttttatacag gtatggaaaa

20

<210> 36  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 36  
aacggataga gtaagttatt

20

<210> 37  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 37  
acatttctag catataacag

20

<210> 38  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 38  
taacaaacca gtaagaatta

20

<210> 39  
<211> 20  
<212> ADN



<213> Homo sapiens

<400> 39

tttcttgtag tatgaaaaag

20

<210> 40

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 40

gaaaacctca gtaagaaagt

20

<210> 41

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 41

tgtttttcag gccttcaact

20

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 42

tgaaaaacag gtttgcttgg

20

<210> 43

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 43

ttcctttaag attgaagacc

20

<210> 44

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 44

gtttcctaaa gtaagtat

20

<210> 45

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 45

gtgcttacag tgaagaaat

20

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens



<400> 46  
tgaataacaag gtaagctggtt 20

<210> 47  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 47  
ttggttttag aatctcagta 20

<210> 48  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 48  
ggaaactaag gtagattttc 20

<210> 49  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 49  
tatgttgag gctttactca 20

<210> 50  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 50  
tacaaaacag gtaagtatca 20

<210> 51  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 51  
tactttgtag gctctgggtcg 20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/FR 00/01887

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12Q1/68 A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LABERGE ET AL.: "FAMILIAL CAVERNOUS ANGIOMAS CCM1 GENE" EUR. J. HUM. GEN., vol. 6/suppl.1, May 1998 (1998-05), page 146/P4.168 XP002136142 the whole document	1-24
Y	----- SEREBRIISKII ET AL.: "ASSOCIATION OF KREV-1/RAP1A WITH KRIT1, A NOVEL ANKYRIN REPEAT-CONTAINING PROTEIN ENCODED BY A GENE MAPPING TO 7q21-22" ONCOGENE, vol. 15, 1997, pages 1043-1049, XP000892143 the whole document ----- -/-	1-24



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 October 2000

Date of mailing of the international search report

09/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/FR 00/01887

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LABERGE ET AL.: "GENETIC HETEROGENEITY AND ABSENCE OF FOUNDER EFFECT IN A SERIES OF 36 FRENCH CEREBRAL CAVERNOUS ANGIOMAS FAMILIES"</p> <p>EUR.J.HUM.GEN.. vol. 7, May 1999 (1999-05), pages 499-504, XP000892146 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>CRAIG ET AL.: "MULTILOCUS LINKAGE IDENTIFIES TWO NEW LOCI FOR A MENDELIAN FORM OF STROKE, CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATION, AT 7p15-13 AND 3q25.2-27"</p> <p>HUM.MOL.GEN.. vol. 7, no. 12, 1998, pages 1851-1858, XP002136143 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
P,Y	<p>SAHOO ET AL.: "Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rapla binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1) "</p> <p>HUM.MOL.GEN.. vol. 8, no. 12, November 1999 (1999-11), XP002136144 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-24
P,Y	<p>COUTEULX SOPHIE LABERGE-LE ET AL: "Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas."</p> <p>NATURE GENETICS, vol. 23, no. 2, October 1999 (1999-10), pages 189-193, XP002151276 ISSN: 1061-4036 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24



A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12Q1/68 A61P43/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	LABERGE ET AL.: "FAMILIAL CAVERNOUS ANGIOMAS CCM1 GENE" EUR.J.HUM.GEN., vol. 6/suppl.1, mai 1998 (1998-05), page 146/P4.168 XP002136142 le document en entier	1-24
Y	SEREBRIISKII ET AL.: "ASSOCIATION OF KREV-1/RAP1A WITH KRIT1, A NOVEL ANKYRIN REPEAT-CONTAINING PROTEIN ENCODED BY A GENE MAPPING TO 7q21-22" ONCOGENE, vol. 15, 1997, pages 1043-1049, XP000892143 le document en entier	1-24

---  
-/--



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eponi,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hagenmaier, S

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 00/01887

C. (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
A	<p>LABERGE ET AL.: "GENETIC HETEROGENEITY AND ABSENCE OF FOUNDER EFFECT IN A SERIES OF 36 FRENCH CEREBRAL CAVERNOUS ANGIOMAS FAMILIES"</p> <p>EUR. J. HUM. GEN.,</p> <p>vol. 7, mai 1999 (1999-05), pages 499-504,</p> <p>XP000892146</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	
A	<p>CRAIG ET AL.: "MULTILOCUS LINKAGE IDENTIFIES TWO NEW LOCI FOR A MENDELIAN FORM OF STROKE. CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATION, AT 7p15-13 AND 3q25.2-27"</p> <p>HUM. MOL. GEN.,</p> <p>vol. 7, no. 12, 1998, pages 1851-1858,</p> <p>XP002136143</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	
P, Y	<p>SAHOO ET AL.: "Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rapla binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1) "</p> <p>HUM. MOL. GEN.,</p> <p>vol. 8, no. 12, novembre 1999 (1999-11),</p> <p>XP002136144</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	1-24
P, Y	<p>COUTEULX SOPHIE LABERGE-LE ET AL:</p> <p>"Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas."</p> <p>NATURE GENETICS,</p> <p>vol. 23, no. 2, octobre 1999 (1999-10),</p> <p>pages 189-193, XP002151276</p> <p>ISSN: 1061-4036</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	1-24